

煅燒廢棄的活性牡蠣殼粉搭配食品塑料包膜之抑菌作用

1. 財團法人農業科技研究院，台灣新竹 30093; 9629505.bce96g@g2.nctu.edu.tw
2. 國立臺灣海洋大學 生命科學暨生物科技學系，台灣基隆 20224; ja1592ck@gmail.com
3. 工業技術研究院 材料與化工研究所 水科技部，台灣新竹 31057; sy1012@itri.org.tw
4. 行政院農委會 漁業署 海鮮科技部，台灣基隆 20224; klkuo@mail.tfrin.gov.tw
5. 聯繫單位: amperehwang@gmail.com; Tel:+886-2-2462-2192 (分機:5570)

修訂:2018/7/1; 接受:2018/7/31; 發行:2018/8/7

摘要

煅燒廢棄的牡蠣殼粉具有它的附加價值，我們將牡蠣殼粉經過煅燒處理之後與 PE 塑膠袋結合，由於它會產生氧化鈣而具有抑菌效果。然而，此研究報告是為了探討煅燒後的牡蠣殼粉，使用不同的濃度比例結合於 PE 中。在 PE 塑膠袋成份裡面含有 9%到 11%的牡蠣殼粉即可呈現出抑菌效果。再者，我們將生鮮魚肉包裝到含有牡蠣殼粉濃度 9%到 11%的 PE 塑膠袋裡，靜置五天；並對照於另一組將生鮮魚肉包裝於含 0%的牡蠣殼粉的 PE 塑膠袋裡，靜置三天。相較之下，我們發現兩組的 TVC 值相當接近。此外，當我們在庚烷、乙醇和醋酸之下進行金屬游移測試時，我們證明了含有牡蠣殼粉的 PE 塑膠袋在溶劑中具有它的穩定性。結果發現含有牡蠣殼粉的 PE 塑膠袋保留了抑菌效果。另外我們也發現了含有牡蠣殼粉的 PE 塑膠袋能夠延長生鮮魚肉的保存期限並且也降低對於金屬外洩安全性的疑慮。

關鍵字：生物廢棄處理、煅燒廢棄的牡蠣殼、抑菌、抑菌效果

1. 前言

淡水蛤(*Corbicula fluminea*)在台灣成功地被繁殖，並且牡蠣的熱水萃取技術已經被應用於健康產品、化妝品耗材並外銷至其他的亞洲國家。少部分的殼粉被用來做為食品添加物，其餘的大部分都被視為商業廢棄物。近十年來，關於牡蠣在水產業界的平均年產量大約在 11000 噸以上，扣掉可以食用的部分(總重量的 20%到 30%)，因此，每年大約有 8000 噸的牡蠣殼被浪費。但是，近幾年來，煅燒廢棄的牡蠣殼粉成為了學術界的研究重點，由於它的成本低廉、取得容易、生物相容性和化學表面處理的潛力。將這些廢棄物轉變成具有高附加價值的產品，已經開始受到高度重視。基於經濟上與環境上的利益，貝殼廢棄物的使用研究已經持續了幾十年。牡蠣殼廢棄物中的主要成份是從三氧化鈣中分解出來的氧化鈣，這些成份可以用來做為水處理和建材以及酯化作用的催化劑。

然而，Fang et al. 表示貝類的重金屬濃度高於貽貝的重金屬濃度。此外，Al-Jaberi 也發現牡蠣殼的重金屬(銀、鋅、鉛、鎳、碳、鉻、鋁、銅、錳和鐵)含量明顯增加。對於此研究計畫，

相當重要。也就是說，我們必須更加注意其重金屬的含量，以符合台灣食藥署的標準。當我們從不同的來源處選用殼粉的同時，食藥署也禁止我們故意將「鉛」和「鎘」流入包裝原料裡。然而，在此研究計畫裡，我們監控了殼粉的重金屬含量以及包裝原料游移試驗，藉由原料的重量，重金屬鉛和鎘的含量低於 100 ppm，在做移動測試的洗滌液當中，重金屬必須在 1 ppm 以下。此外，近來所發表的刊物都表示，煨燒處理過的殼粉都具有抑菌的特性。從煨燒殼粉中所生成的活性氧會破壞微生物細胞。但是，在坊間市場上，很難買到用煨燒殼粉製成的家用抗菌劑。煨燒後的殼類，其主要成份「一氧化碳」屬於固態，具有高度的親水性，與周圍的水氣產生作用而形成氫氧化鈣，此反應具有高度放熱性。它也具有腐蝕性會導致嚴重的皮膚和呼吸道灼傷。

微生物添加劑是食品保存觀念的其中一項，這個觀念的應用透過延長保存期限的方式，可以符合消費者的高品質和高安全性的要求。直接把抗微生物的方式導入食品中可能會造成與食品成分，像是脂肪或蛋白質的偶發性交互作用。有一個可行的辦法就是在食品包裝的製程中加入抗微生物的添加劑，在分佈的過程中，含有抗微生物劑的包膜能夠更有效地控制抗微生物劑在食品中的游移分佈。然而，抗微生物的合成與食品包裝原料的結合引發了極大的關注，目前，極細微構造(nanostructured)、植物萃取抗微生物劑、酵素和紅菌殺菌素都普遍地被運用在抗微生物的包裝研究上。天然的抗微生物因子有安全性和非安全性的兩種，這些抗微生物因子在塑膠製品中彼此結合用來測試對抗各個種類的微生物。但是，其安全性、衛生規範和製造成本限制了它的商業價值性和產量。因此，基於環境保護的發展，將經濟實惠的抗菌添加物運用在食品包裝上已經成在科學應用上和商業利益上的重要議題。

Hamester et al. 的研究報告指出，經過煨燒之後的牡蠣殼和貝類殼(內含 98.2%到 95.7%的一氧化碳)可能會取代目前坊間的 PP 填裝容器。再者，如果 PP 的成分中含有 10%的氧化鈣，在包裝的物理特性上也不會有任何明顯的改變。然而，就我們目前所知，將煨燒之後的廢棄殼粉融入 PE 內應用在包裝上的應用，目前還沒有出現在任何的相關研究或文獻資料。因此，在這個研究計畫裡，將各種不同濃度的煨燒殼粉結合於 PE 之中，並透過掃描式電子顯微鏡、傅立葉紅外線光譜儀、金屬游移以及抗微生物活動力化驗來分析出它的特性。

我們的目的就是要發展食品包裝應用的原料。

2. 原料與方法

2.1 煨燒廢棄的牡蠣殼以及含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋

淡水牡蠣殼是由台灣花蓮的一家餐廳所提供。經過清洗之後，將牡蠣殼浸泡在乙酸溶劑裡，目的是要清除最外層的生物組織層和角質層，然後再用去離子水沖洗使之變成中性物質。用攝氏 200 度 C 的高溫烘烤貝殼一個小時藉以蒸發貝殼裡面的水汽並降低它的易脆性。乾燥的貝殼用微型攪拌機研磨成粉狀，再加熱至攝氏 800 度 C 約一個半小時，然後再用球磨機不加水做二次研磨而產出煨燒廢棄殼粉的樣品。PE 的原料中有一種類叫做 LLDPE，LLDPE 在食品包裝上具有高度黏著性和防穿刺。PE 塑膠袋和含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋是由台灣東元塑膠工業股份有限公司合作共同生產。在混合之前，PE 和煨燒的殼粉放置於烤箱裡面烘乾，然後再將它們混合並讓它們的濃度分別達到 0%、7%、9%和 11%(重量百分比)，然後再將這些混合物放入射出成型機裡製成含有煨燒殼粉的塑膠袋(W)20cm x (L)40cm(厚度)0.05mm。它的擠壓溫度和螺旋轉動率分別為攝氏 210 度和每分鐘 100M。

所有其他所使用的化學品皆屬於分析用的等級。

2.2 煨燒廢棄的牡蠣殼以及含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋之特性

使用 Zeta 粒徑分析儀來決定煨燒殼粉的平均粒徑大小。透過能量射線光譜儀搭配掃描式電子顯微鏡來決定煨燒後的殼粉和含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋，它們的原子組成和型態，以 10000 伏特的加速電壓在日本 JEOL JSM6500F 的顯微鏡上面做執行，使用有傳導性的黏著劑將標本放置於顯微鏡底下，標

本會被黏貼在銅箔膠帶上面。任何多餘的樣品被排除之後，在顯微鏡下面的標本在零污染的環境下變得乾燥，然後存放於電子乾燥箱中供掃描式電子顯微鏡做解析。當我們以 500-3600 nm 的波長來記錄傅立葉紅外線光譜儀所測出的光譜的同時，我們也利用傅立葉紅外線光譜儀搭配溴化鉀粉來觀察出煨燒後的牡蠣殼和含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋，它們兩者的分子結構。

2.3 煨燒廢棄的牡蠣殼以及含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋之金屬游移測試

這個測試是依循食藥署的規範，評估其原料從包裝原料本身到食物之間的移動。將包裝袋完全浸泡在溶劑裡面，藉以執行該原料從含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋移動到水性和油性食物之間的游移模擬測試，其溶劑的成分包含 DD 水、4%的乙酸、20%乙醇和己烷。分別將含有 0%、7%、9%和 11%的含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋切割成 1 平方公分的膠膜，然後將它們完全浸泡於用毛玻璃蓋塞住的管狀物內的 2 毫升的溶劑裡。這些浸泡於 DD 水、4%的乙酸、20%乙醇和己烷的膠膜被存放於溫度控制在攝氏 60 度 C 到攝氏 90 度 C 的水裡 30 分鐘。浸泡於己烷的膠膜以攝氏 25 度 C 的溫度被存放 60 分鐘，然後，利用「感應耦合電漿質譜儀」分析其樣品。

2.4 感應耦合電漿質譜儀的分析與分解

煨燒之後的殼粉、PE 塑膠袋以及金屬游移測試的樣品被解析出鈣、鉛還有銅等離子。用感應耦合電漿質譜儀分析出鎘的含量。用攪拌機把煨燒後的殼粉和 PE 塑膠袋均勻地研磨成粉末。用 4 毫升的硝酸分解 60 毫克的乾燥樣品並放進微波爐裡面 25 分鐘。在相同的條件之下，用 4 毫升的硝酸去分解 1 毫升的游移測試樣品。其作用的條件如下：噴霧氣體(氬)流率：每分鐘 1.05L；輔助氣(氬)流：每分鐘 0.8L；電漿氣(氬)流：每分鐘 0.14L；反應氣流(氬)：每分鐘 4.3mL；鏡片電壓 7.2 伏特；ICP RF 電源 1550 瓦；氧化鈣/鈣=2%以及 2 價鋇/鋇=2%。被用在量測與計算的金屬同位素為 ⁴⁴鈣、²⁰⁸鉛、⁶³銅和 ¹¹²鎘。為了檢測分解過程中和樣品操作的污染物質，準備一罐純洗劑用在每一組的分析中，每一組樣品分析三次，其結果都在標準誤差正負範圍之內。

2.5 含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋之抗菌活動

這個測試是依循日本工業標準(JIS) Z 2801:2000 抗微生物產品測試方法，這個方法對於抗微生物產品可以有效地標準化和評估抗微生物的效果。被用來覆蓋接種體的樣品為(W)5cm x (L)5cm x (厚度)0.05mm 從少量的煨燒殼粉 PE 塑膠袋上剪下其小塑膠片，而這些塑膠袋在測試前用試驗級的乙醇事先清洗過。在測試前，被清洗過的樣品放在空氣中烘乾 72 小時。利用黃金葡萄球菌 ATCC 6538P 和大腸桿菌 ATCC 8739 來做為接種體。接種體被營養湯品稀釋到目標濃度每毫升 5.03-5.12Log CFU。0.4 毫升的接種體加入於每個樣品上面，然後在 35 度 C 和至少 90%的相對濕度環境中培養 24 小時。在每個樣品上面的接種體從 0 到 24 小時測試三份而建立有機的生存能力。樣品裡面的接種體被營養湯品和食物給稀釋。所有的食物都在 35 度 C 的環境之下培養 24 小時。培養之後，統計並記錄細菌的菌落數。抗微生物活動=(Log CFU 0%的煨燒殼粉 PE 塑膠袋在 24 小時的環境中)-(Log CFU 7%、9%和 11%的煨燒殼粉 PE 塑膠袋在 24 小時的環境中)。當抗菌活動(RA)為 2.0 以上時，抗菌產品取決於他的抗菌效果。

2.6 生鮮魚肉的存放對於含有煨燒殼粉 PE 塑膠袋的微生物穩定性

從台灣基隆的傳統市場裡取得的生鮮魚肉裡面含有不明的微生物污染物質。煨燒過的殼粉 PE 塑膠袋(W)20cm x (L)40cm x (厚度)0.05mm，其殼粉的濃度有 0%、7%、9%和 11%，在測試前，用試劑級的乙醇做清洗然後風乾 72 小時。被用來覆蓋接種體的樣品，其規格為(W)5cm x (L)5cm x (厚度)0.05mm 的塑膠片，從含有少量的煨燒後殼粉 PE 塑膠袋上面剪下來的，並且該樣品在測試前，先用試劑級的乙醇做清洗然後風乾 72 小時。把 10 克大小的生鮮魚肉放進含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋裡，在除氣的條件下進行包裝，被包裝的魚肉冷藏在 4 度 C 的冰箱裡，然後連續五天持續測量它的 TVC 值。

2.7 統計數據的解析

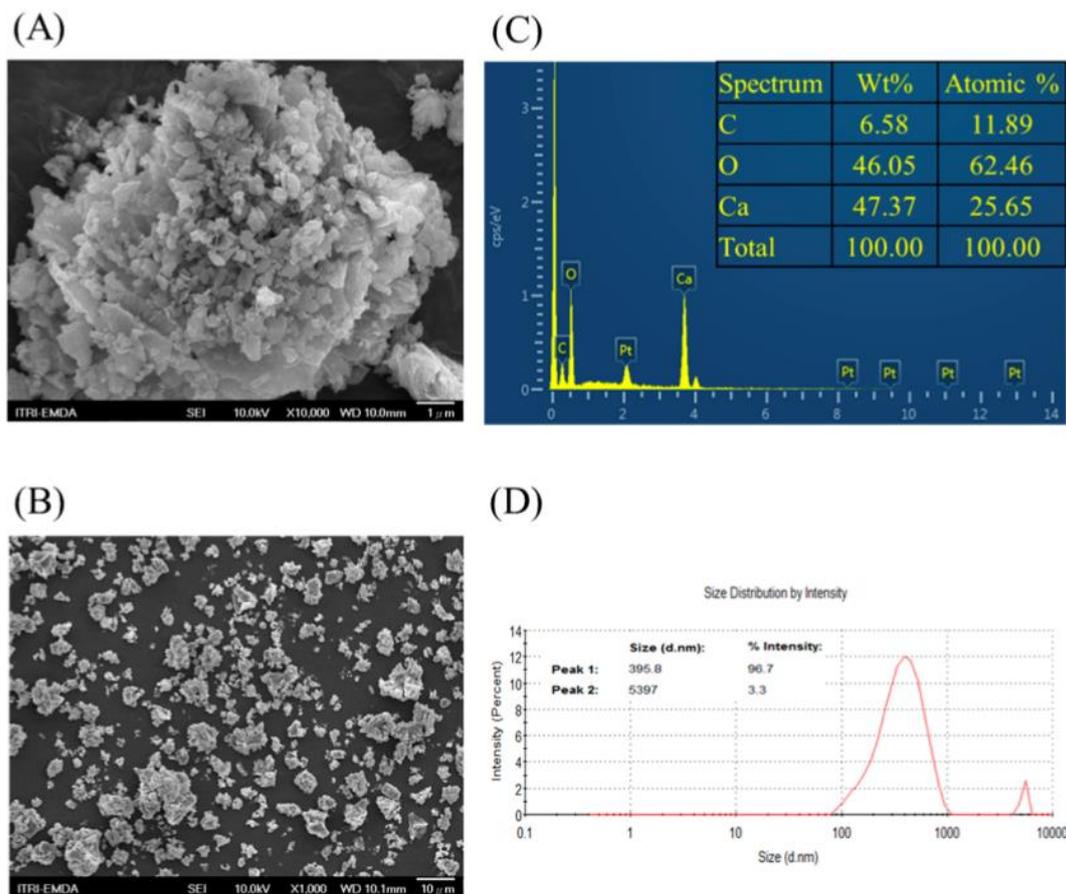
數據資料所有的顯示都在標準正負誤差範圍之內，其資料都是運用「變異數分析」的方式來做分析。而 $p < 0.05$ 被視為是一種重要的變異。

3. 結果

3.1 從型態上觀察煨燒廢棄的牡蠣殼粉和含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋

在當前的研究報告裡，PE 塑膠抗微生物添加物和煨燒後的牡蠣殼是從牡蠣殼經過攝氏 800 度 C 的煨燒 1.5 小時而衍生出來的。Hu et al. 在報告中指出煨燒的溫度一旦超過 800 度 C，煨燒淡水貝類的繞射型態呈現出氧化鈣，氧化鈣是從天然貝類中的三氧化鈣分解而成。煨燒後的牡蠣殼粉的型態可以透過 SEM 測試出來。我們以 10000X 和 1000X 的放大倍數來看，煨燒牡蠣殼粉的樣本影像如圖一的 A 和 B。煨燒的蛤蠣殼粉聚集在一起而呈現多孔的結構。透過 EDS 當地的化學解析指出其主要的元素包含鈣 (47.37% 的重量和 25.65% 的原子重量)、氧 (46.05% 的重量和 62.46% 的原子重量)、碳 (6.58% 的重量和 11.89% 的原子重量)。煨燒牡蠣殼粉的影像如圖一的 C，它們的平均粒徑大約為 395.8 nm (96.7%) (如圖一的 D) 與動態光散射的量測方式是一致的。

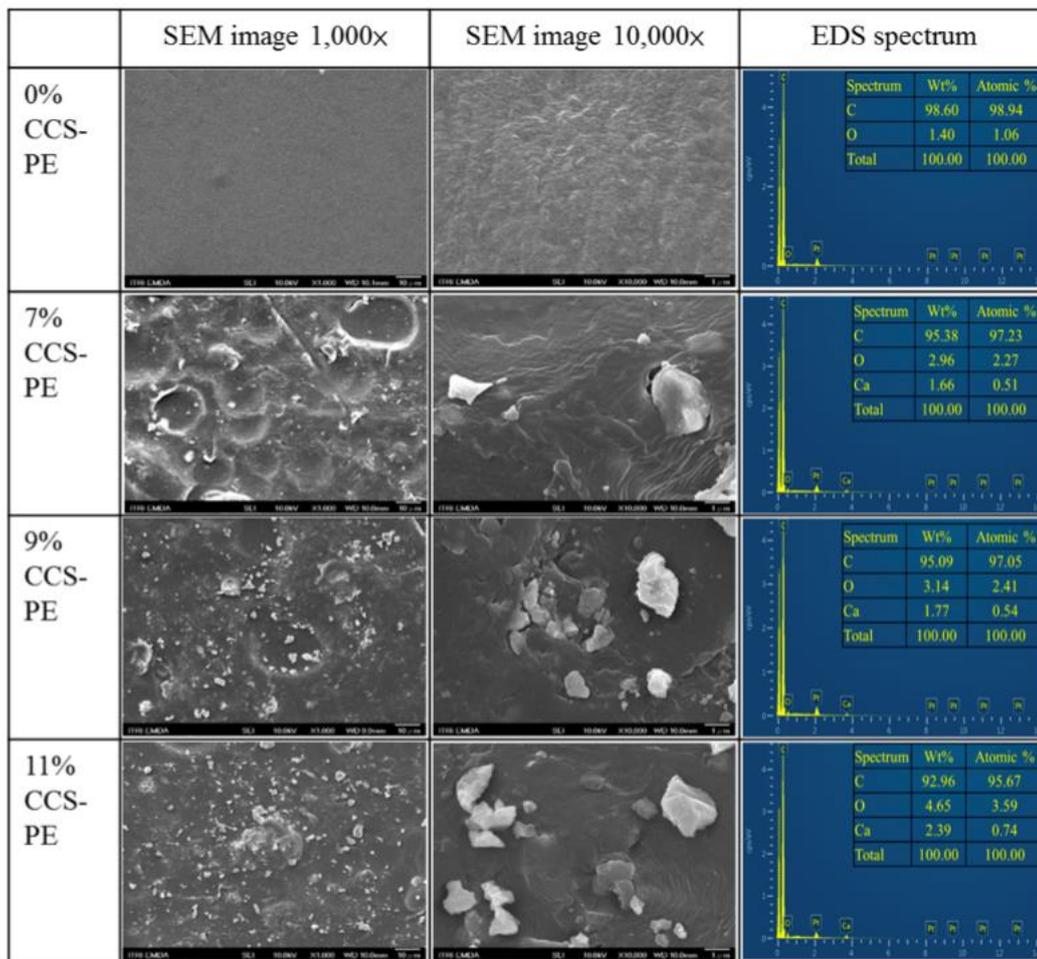
(圖一)



煨燒後的牡蠣殼粉 PE 塑膠袋，它的表面型態也可以透過 SEM 測試出來。含有煨燒牡蠣殼粉濃度為 7%、9% 和 11% 的樣本影像如圖二。在顯微影像裡，白點呈現不規則的顆粒狀。用 1000X 的放大倍數來看，含有 9% 和 10% 的殼粉濃度的袋子，其裡面的殼粉分布比較鬆散，但是還是有一些部分比較密集。換句話說，含有殼粉濃度 7% 的 PE 塑膠袋的型態呈現出比較粗糙，而含有殼粉濃度 9% 和 11% 的 PE 塑膠袋其型態呈現比較平滑，此現象代表煨燒後的牡蠣殼粉都呈現在 PE 塑膠袋上。Diez-Pascual 和

Diez-Vicente 兩位學者的研究報告也指出，含有 10% 的氧化鋅聚酯纖維(3-羥基丁酸)膠膜相較於僅含 1% 的氧化鋅聚酯纖維(3-羥基丁酸)膠膜其形態比較平滑。除此之外，Yao et al. 和 Shnawa et al. 指出，當殼粉含量能夠促進 PE 的異質成核而製造出不同的表面型態的時候，PE 的結晶度和熱流穩定度會隨著殼粉含量的增加而增加。當我們用 10000X 的放大倍數來觀察含有煅燒牡蠣殼粉的 PE 塑膠袋時，我們發現到有部分的殼粉卡在膠膜裡面，而有些部分則的殼粉則暴露在外頭。因此，會導致有些殼粉會直接與內容物接觸到，於是，我們在不同的溶劑底下做了殼粉的游移測試。我們透過 SEM-EDS 來偵測含有殼粉的塑膠袋，偵測它的原子組成，並且我們可以確定的是鈣離子會隨著殼粉的增加而增加。(如圖二)

(圖二)

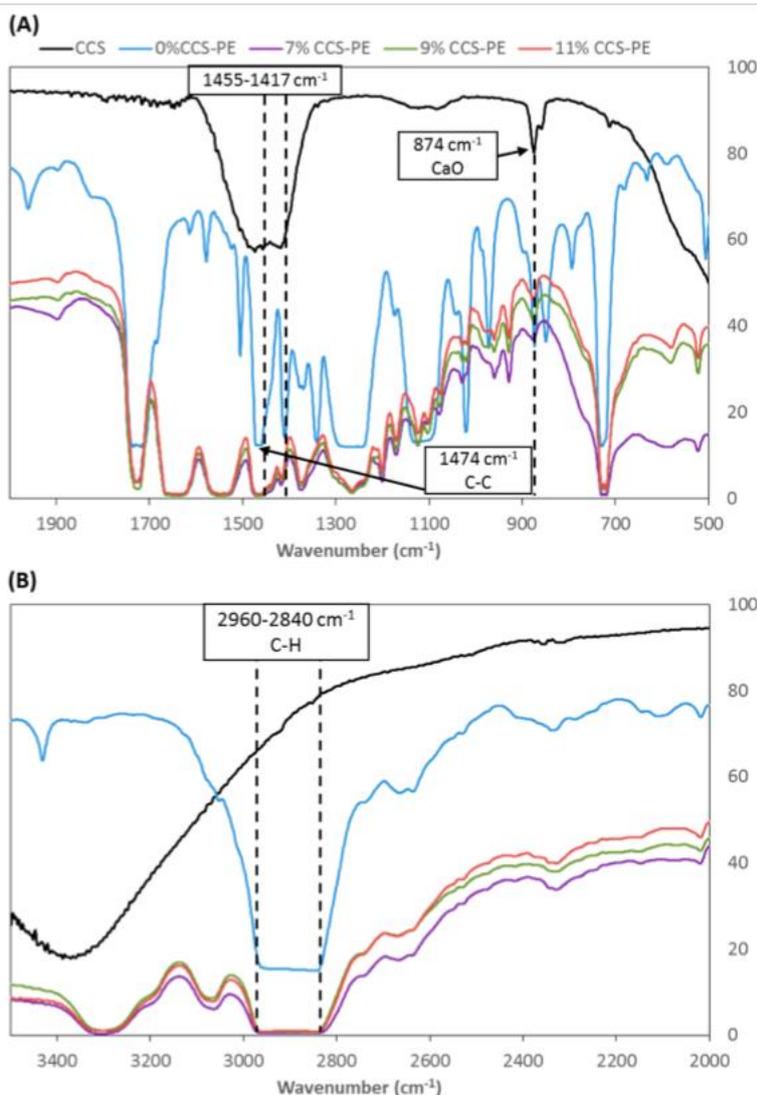


3.2 煅燒後的牡蠣殼粉和含有煅燒殼粉的 PE 塑膠袋之傅立葉紅外線光譜

傅立葉紅外線光譜的分析提供了更進一步的證據證明了煅燒後的牡蠣殼粉分佈於 PE 塑膠袋上面。將含有 0%、7%、9% 和 11% 殼粉濃度的 PE 塑膠袋放置於傅立葉紅外線光譜儀上做分析，如圖三。煅燒後的牡蠣殼粉分別在 874cm^{-1} 和 $1417\text{--}1455\text{cm}^{-1}$ 這兩個波段呈現出比較活耀的狀態，如圖三(A)。由於鈣離子的關係，所以呈現出強烈 IR 吸收波段 874cm^{-1} 。 $1417\text{--}1455\text{cm}^{-1}$ 之間的波段剛好相同於單一鋸齒狀碳酸鹽的對稱延伸變異。這是因為在煅燒期間具有高度敏感性的氧化鈣表面區域暴露在空氣之中，形成大

量的二氧化碳和水，而二氧化碳和水在氧化鈣的表面被吸收而形成氫和碳。Perea et al. 也展示煅燒過的貝殼也有它的極限在 1455cm^{-1} 並且我們的研究結果和他們的發現是一致的。換句話說，純 PE 塑膠袋呈現出非常強烈的波段在 $2840\text{-}2960\text{cm}^{-1}$ 之間，如圖三(B)以及另一個波段 1474cm^{-1} 。 $2840\text{-}2960\text{cm}^{-1}$ 範圍的波段相同於 C-H 延伸變異， 1474cm^{-1} 的波段相同於 C-C 延伸鍵，這也符合了 PE 吸收波段的特性。此外，在 $3300\text{-}3400\text{cm}^{-1}$ 之間有一個廣大的波段，這可以歸因於在物理性吸附水中的氫氧根，其氫鍵表面的延伸彎曲變異。這也揭露了從煅燒殼粉中，水分子在氧化鈣和三氧化鈣中被保留下來。濃度 7%、9% 和 11% 所呈現出的光譜代表它們具有殼粉和含有殼粉的 PE 塑膠袋的特殊鍵。再者，在 874cm^{-1} 的氧化鈣延伸鍵上呈現出比較密集的狀態，這也意味著它具有較高的殼粉含量。

(圖三)



3.3 在不同的溶劑中，煅燒後的牡蠣殼粉和含有煅燒殼粉的 PE 塑膠袋的游移測試

以 10000X 的放大倍數透過 SEM 影像做型態觀察發現殼粉呈現於 PE 膠膜上，而有些殼粉則暴露在外面，因此，有些殼粉可能會直接與包裝內容物接觸到，這個會使人擔心可能金屬會外洩到包裝內容物裡面。我們在不同的溶劑中，用放大測試去觀察金屬污染物的可能性。在塑膠食品容器裡面的一些合成物，它們會游移到食物裡面，這是一直以來眾所皆知的事。食藥署明令禁止刻意的將鉛和銅納入包裝原料當中，而他們也對於重金屬鉛和銅設定了一些限制在 100 ppm 以下，以及在游移測試的洗滌液裡重金屬必須在 1 ppm 以下。由於工業化和污染物已經造成了生物化學的改變，重金屬源自於河流裡面的水，這些重金屬影響了貝殼的生長並且長年累積。Al-Jaberi 的研究報告指出牡蠣殼的重金屬含量已經明顯的增加，根據圖二的顯示，從牡蠣殼煅燒之後變成的殼粉結合於 PE 膠膜中，有可能會與食物

直接接觸。在這裡，我們透過 ICP-AES 將四個原子鈣、鉛、銅、鎘給量化。

煅燒殼粉的主要組成：53.1%的鈣中含有微量鉛($2.58 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$)、銅 ($14.50 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$) 和鎘($17.42 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$)。不含煅燒殼粉的 PE 塑膠袋中也有微量鈣($456.2 \pm 3.14 \mu\text{g/g}$)、鉛 ($53.10 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$)、銅($15.36 \pm 0.55 \mu\text{g/g}$)和鎘($32.65 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$)。煅燒殼粉和 PE 塑膠袋的鉛和鎘含量都在 100 ppm 以下，符合規定(附表一)。含有 0%、7%、9%和 11%殼粉濃度的塑膠袋，它們鈣、鉛、銅、鎘的游移結果呈現在附表一上。含有 0%、7%、9%和 11%殼粉濃度的塑膠袋，它們游移樣品的鉛和鎘含量符合 1 ppm 以下的規定。有趣的是，鈣離子含量在游移測試的所有樣品裡面是較高的。比起在 DD 水、乙醇和庚烷游移樣品測試中，在濃度 4%的乙酸游移樣品中，鈣離子含量是比較高的。在濃度 4%的乙酸洗劑中，95 度 C 的鈣離子含量比 60 度 C 的還高。這個觀察也建議我們當食品在加熱的同時，暴露在高溫之下可能會造成鈣離子從含有殼粉的塑膠袋游移到食物裡的機會增加。Loyo-Rosales et al. 也在他的報告中指出，高溫會加速因子從塑膠容器和游移到食物上面，這同時也說明了較大的塑膠顆粒添加物有比較高的位移性。煅燒後的蛤蠣殼粉其粒徑大約 395.8nm，如圖一(D)，它被視為是一種大型的塑膠添加物並解釋了含有殼粉的 PE 塑膠袋的高鈣離子游移。根據以上的結果，在游移測試的所有樣品裡面，鈣離子數量是高的。尤其在濃度 4%的乙醇洗劑中，溫度 95 度 C 洗 30 分鐘。然而，在所有的樣品裡面，pH 值並沒有顯著的改變。無論如何，含有殼粉的 PE 塑膠袋適用於長期性的包裝，而這些包裝需要再進一步地測試。

(附表一)

Table 1. The calcium and three heavy metals in calcined waste clam shell (CCS), PE plastic bag (0% CCS-PE) and the migration test from CCS-PE plastic bags with different treatments.

Samples				Ca	Pb	Cu	Cd
				(μg/g)			
CCS				53.1%	2.58 ± 0.07	14.50 ± 0.13	17.42 ± 0.31
PE plastic bag				456.2 ± 3.14	53.10 ± 0.12	15.36 ± 0.55	32.65 ± 0.06
Migration test	Solvent	Treatment		Ca	Pb	Cu	Cd
		Temperature	Time	(ppb)			
0% CCS-PE	DD water	60 °C	30 min	10.92 ± 0.23	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	18.82 ± 0.17	nd	nd	nd
	4% acetic acid	60 °C	30 min	15.75 ± 0.36	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	21.14 ± 0.22	nd	nd	nd
	20% ethanol	60 °C	30 min	16.83 ± 0.29	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	15.54 ± 0.16	nd	nd	nd
heptane	25 °C	60 min	19.24 ± 0.15	nd	nd	nd	
7% CCS-PE	DD water	60 °C	30 min	106.33 ± 0.30	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	167.20 ± 0.21	nd	nd	nd
	4% acetic acid	60 °C	30 min	308.82 ± 0.18	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	551.70 ± 0.14	nd	nd	nd
	20% ethanol	60 °C	30 min	239.10 ± 0.17	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	370.90 ± 0.36	nd	nd	nd
heptane	25 °C	60 min	112.21 ± 0.31	nd	nd	nd	
9% CCS-PE	DD water	60 °C	30 min	88.44 ± 0.12	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	113.13 ± 0.28	nd	nd	nd
	4% acetic acid	60 °C	30 min	381.40 ± 0.15	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	523.34 ± 0.20	nd	nd	nd
	20% ethanol	60 °C	30 min	167.44 ± 0.19	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	200.31 ± 0.18	nd	nd	nd
heptane	25 °C	60 min	198.16 ± 0.25	nd	nd	nd	
11% CCS-PE	DD water	60 °C	30 min	138.01 ± 0.24	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	142.01 ± 0.18	nd	nd	nd
	4% acetic acid	60 °C	30 min	711.07 ± 0.35	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	841.22 ± 0.29	nd	nd	nd
	20% ethanol	60 °C	30 min	178.60 ± 0.20	nd	nd	nd
		95 °C	30 min	163.11 ± 0.24	nd	nd	nd
heptane	25 °C	60 min	134.69 ± 0.15	nd	nd	nd	

Data are reported as mean ± SD (n = 3). Nd: not detected. (All results are reported with Pb < 2 ppb, Cu < 0.5 ppb, and Cd < 1 ppb, respectively).

3.4 煨燒後的牡蠣殼粉和含有煨燒殼粉的 PE 塑膠袋對抗微生物金色葡萄球菌 ATCC 6538P 和大腸桿菌 ATCC 8739 之效果

在近期的刊物中曾經指出煨燒後的殼粉具有抑菌的特性，從煨燒殼粉中所生成的活性氧去破壞微生物細胞，抗微生物的化合物質與食品包裝原料結合已受到相當大的關注。基於這一點，我們針對兩種人類病原體的細菌：金色葡萄球菌(革蘭氏細菌-陽性)和大腸桿菌(革蘭氏細菌-陰性)，分別在含有殼粉濃度 7%、9%和 11%的塑膠袋中做抗菌活動的測試，其結果如附表二，經過培育之後，細菌的孳生樹隨著殼粉的濃度增加而減少。根據日本工業標準(JIS) Z 2801:2000 抗微生物產品測試方法，當抑菌活動(R)在 2.0 以上的時候，抑菌產品取決於它的抑菌效果。並且我們也觀察到含有殼粉濃度 9%和 11%的塑膠袋，他們的抑菌活動(R)值都超過或是非常接近 2.0。殼粉暴露在表面較大的區塊可能也說明了 9%和 11%的 PE 塑膠袋有比較強烈的抑菌效果。殺菌效果是源自於塑膠袋中的鹼性氧化鈣，氧化鈣是煨燒貝殼所生成的主要成分，它可以生成活性氧，例如超氧化負離子，並且我們也在粉漿中觀察到它的活動。煨燒水產貝殼對於大腸桿菌和黃金葡萄球菌的抗菌敏感性所造成的改變相同於活性氧化處理所造成的改變。從氧化鈣(煨燒水產貝殼而生成)中生成的活性氧也是抑菌活動中的主要機制。氧化鈣屬於固體，它有高度的親水性，並且它會和周邊的水汽做反應而形成氫氧化鈣。含有殼粉的塑膠袋，它的抗菌機制是氧化鈣與接種體做反應而形成氫氧化鈣伴隨著熱氣產生。氫氧化鈉改變了細胞壁上的細菌脂多醣體的生物特性以及惰性薄膜傳導機制，這些現象都會產生細胞毒性。氫氧化鈉的主要優點在於它不需要直接接觸，利用吸收二氧化碳就能夠殺死微生物。再者，含有殼粉的塑膠袋，它對於抑制大腸桿菌的效果比較高於抑制黃金葡萄球菌。抑制大腸桿菌和抑制黃金葡萄球菌產生出不同的情況，這要歸咎於細胞表面的組成不同。Sawai et al. 也在報告中指出，相較於大腸桿菌、沙門氏菌和枯草桿菌，黃金葡萄球菌的張力比較能夠抵抗煨燒殼粉。

(附表二)

Table 2. Effect of 0%, 7%, 9%, and 11% CCS-PE plastic bags on the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P and *Escherichia coli* ATCC 8739.

Samples	Log CFU/mL at 0 h	Log CFU/mL at 24 h	Antimicrobial activity (R) *
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			
0% CCS-PE	5.12 ± 0.10 **	8.13 ± 0.21	
7% CCS-PE	5.12 ± 0.10	6.84 ± 0.28	1.29
9% CCS-PE	5.12 ± 0.10	5.68 ± 0.16	2.45
11% CCS-PE	5.12 ± 0.10	5.75 ± 0.08	2.38
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P			
0% CCS-PE	5.03 ± 0.07	7.96 ± 0.18	
7% CCS-PE	5.03 ± 0.07	7.13 ± 0.15	0.83
9% CCS-PE	5.03 ± 0.07	6.15 ± 0.25	1.81
11% CCS-PE	5.03 ± 0.07	5.60 ± 0.35	2.36

* Antimicrobial activity = (Log CFU from 0% CCS-PE at 24 h) – (Log CFU from 7%, 9% and 11% CCS-PE at 24 h), an antibacterial product was determined to have antibacterial effectiveness when the antibacterial activity (R) was 2.0 or more. ** Results are reported as mean ± SD (n = 5) colony forming units (CFU) (log₁₀/mL).

3.4 在 4 度 C 的溫度下，煅燒的牡蠣殼粉和含有煅燒殼粉的 PE 塑膠袋之抑菌效果對於生鮮魚肉的 TVC

以上的結論說明了含有煅燒殼粉的 PE 塑膠包裝袋防止細菌污染的潛在能力，煅燒殼粉呈現出抗微生物的效果，也降低與融化 PE 直接接觸的風險。在此，我們用魚肉放在攝氏 4 度 C 的溫度底下測試它的抑菌效果。將生鮮魚肉包裝起來，以 4.08 Log CFU/g. 來做觀察，隨即發現有初步的微生物污染。我們使用不含殼粉的包裝袋來包裝生鮮魚肉，其 TVC 曲線呈現微生物污染與保存時間的關係。在所有包裝中，除了含有殼粉濃度 0% 和 7% 的塑膠袋以外，微生物污染 ($p < 0.05$) 有明顯的減少。透過增加殼粉的濃度，PE 袋的抑菌效果隨之增加。用殼粉濃度 9% 和 11% 的 PE 塑膠袋將生鮮魚肉包裝存放 5 天，它的 TVC 值在 6.09 和 5.98 Log CFU/g，這個數值接近於使用不含殼粉的塑膠袋包裝魚肉存放 3 天所呈現的數值 (5.99 Log CFU/g) (如圖四)。含有殼粉濃度 9% 和 11% 的 PE 塑膠袋能夠延長生鮮魚肉的保存時間。但是含有殼粉濃度 11% 的 PE 塑膠袋，它的抑菌能力比起 9% 濃度的袋子，並沒有比較強烈。Sawai et al. 的研究報告中指出在艾美氏的文章中提到氧化鈣和煅燒後的殼粉都不是誘導有機體突變的物質，並且氧化鈣可以降低它誘變的機會。因此，我們不需要太擔心煅燒殼粉作為抗菌或是抑菌原料的安全性。此外，一旦含有煅燒殼粉的 PE 塑膠品質下降，它就會透過吸收空氣中的二氧化碳使煅燒後的殼粉回復成三氧化鈣，並且相較於其他的抗菌金屬氧化物，例如氧化鎂、氧化鋅、三氧化二鋁、氧化銅、三氧化二鉻、三氧化二鎳或三氧化二錳，它比較不擔心有金屬污染的問題。

(圖四)

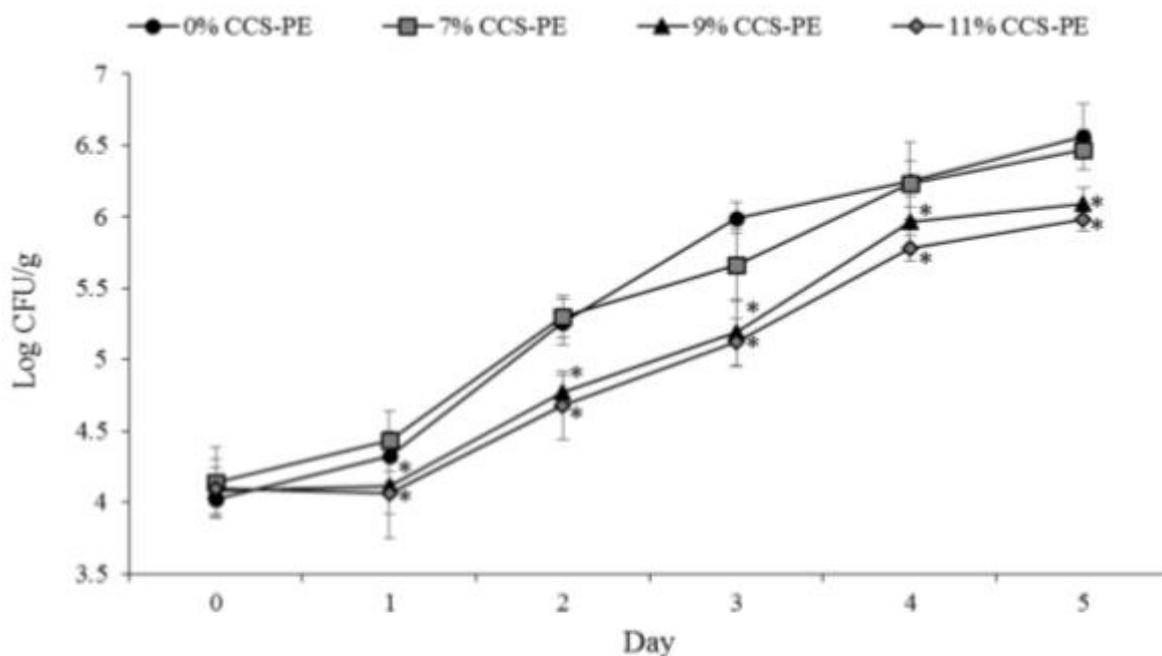


Figure 4. Effect of 0%, 7%, 9%, and 11% CCS-PE plastic bags on the total aerobic viable counts (TVC) of raw fish fillet. Results are reported as mean \pm SD ($n = 5$) colony forming units (CFU) (Log_{10}/g). * $p < 0.05$ when compared with 0% CCS-PE plastic bag group.

3. 結論

這份研究報告說明了 PE 膠膜上面煅燒廢棄牡蠣殼粉所產生的抑菌效果。透過 SEM 影像分析可以看到煅燒殼粉 PE 塑膠袋呈現出平滑的型態。透過傅立葉紅外線光譜技術能夠將煅燒後的殼粉和含有殼粉的 PE 塑膠袋之特性展現出來，並在 874cm^{-1} 、 $1417\text{--}1455\text{cm}^{-1}$ 和 $2840\text{--}2960\text{cm}^{-1}$ 這三個波段中，顯示比較明顯的活動。此外，含有煅燒殼粉 PE 塑膠袋被證實有抑菌效果，我們使用含有殼粉濃度 9% 和 11% 的 PE 塑膠袋包裝生鮮魚肉，他們的 TVC 值比起濃度 0% 的 PE 塑膠袋還要優良。因此，我們證實了煅燒後的牡蠣殼粉搭配 PE 所產生的抑菌效果，和可以延長產品的保存期限 (2 天)，不需擔心金屬外洩的問題。